

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
17 de Abril de 2003 (17.04.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/030891 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes²: A61K 31/20,
A61P 35/00, 9/10, 9/12, 3/04

Campus Universitario, Cr. Valldemossa, Km. 7, 5, Edificio Son Lledó, E-07071 Palma de Mallorca (ES).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00475

(72) Inventor; e

(22) Fecha de presentación internacional:
9 de Octubre de 2002 (09.10.2002)

(75) Inventor/Solicitante (para US solamente): ESCRIBA
RUIZ, Pablo, Vicente [ES/ES]; Campus Universitario,
Cr. Valldemossa, Km. 7, 5, Edificio Son Lledó, E-07071
Palma de Mallorca (ES).

(25) Idioma de presentación: español

(74) Mandatario: ELZABURU, Alberto, de; Miguel Angel,
21, E-28010 Madrid (ES).

(26) Idioma de publicación: español

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,

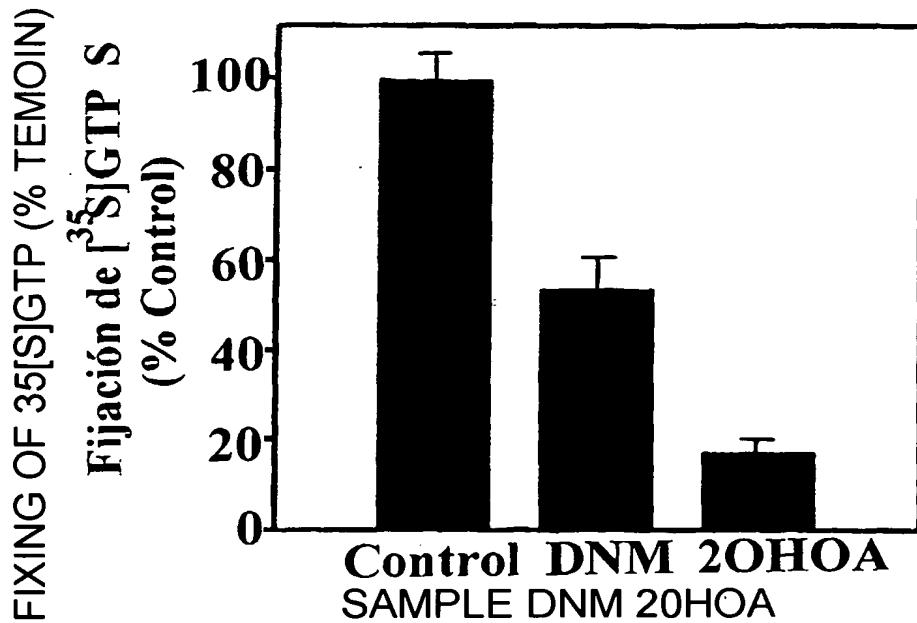
(30) Datos relativos a la prioridad:
P200102269 11 de Octubre de 2001 (11.10.2001) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS [ES/ES];

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: USE OF HYDROXYOLEIC ACID AND SIMILAR COMPOUNDS IN THE PRODUCTION OF MEDICAMENTS

(54) Título: UTILIZACION DEL ACIDO HIDROXIOLEICO Y COMPUESTOS ANALOGOS DEL MISMO EN LA FABRICACION DE MEDICAMENTOS



WO 03/030891 A1

(57) Abstract: The invention relates to the use of hydroxyoleic acid and similar compounds having general formula I: $\text{COOH-CHR-(CH}_2\text{)}\text{m-CH=CH-(CH}_2\text{)}\text{n-CH}_3$, wherein m and n independently represent a value of between 0 and 15 and R can denote any residue having a molecular mass of less than 200 Da. The invention relates to the use of said hydroxyoleic acid and similar compounds in the production of medicaments that are used to treat cancer, hypertension, obesity or diseases caused by an alteration of the membrane structure and the resulting regulation of G proteins or the receptors connected to same.

[Continúa en la página siguiente]



SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados (regional):** patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) **Resumen:** Se describe la utilización del ácido hidroxioleico y análogos de fórmula general I: COOH-CHR-(CH₂)_m-CH=CH-(CH₂)_n-CH₃, en que m y n tienen independientemente un valor de 0-15 y R puede ser cualquier residuo de masa molecular inferior a 200 Da, en la fabricación de medicamentos útiles en el tratamiento del cáncer, la hipertensión, la obesidad o de enfermedades mediadas por alteración de la estructura de membrana y la consiguiente regulación de proteínas G o de los receptores acoplados a las mismas.

- 1 -

**UTILIZACIÓN DEL ACIDO HIDROXIOLEICO Y COMPUESTOS ANÁLOGOS
DEL MISMO EN LA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS**

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a la aplicación del ácido hidroxioleico (2-hidroxioleico) y moléculas de estructura análoga como agentes antitumorales, como agentes con actividad hipotensora y como agentes que permiten inducir reducciones del peso corporal.

10 La presente invención también se refiere a la utilización del ácido 2-hidroxioleico y análogos para regular la estructura de membrana, regular la actividad y/o localización de proteínas G y regular la actividad de receptores acoplados a proteínas G a través de la 15 regulación de la estructura de membrana.

La presente invención también se refiere a la utilización del ácido 2-hidroxioleico y análogos para la fabricación de medicamentos destinados al tratamiento del cáncer, de medicamentos destinados al tratamiento de 20 enfermedades cardiovasculares y de medicamentos destinados al tratamiento de problemas de peso corporal u obesidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los ácidos grasos son moléculas de amplia utilización, 25 tanto en alimentación como en industria. El ácido 2-hidroxioleico, cuya síntesis ha sido descrita con anterioridad (Adam et al., 1998, Eur. J. Org. Chem. 9, 2013-2018), ha sido utilizado de forma industrial como emulsionante para preparaciones de productos cosméticos.

30 Así, por ejemplo, por un lado, la patente JP 10182338 se refiere a una composición emulsionante de aceite en agua que muestra baja irritabilidad y elevada compatibilidad con sales, que contiene: [A] tensioactivos no iónicos tales como monolaurato de polioxietileno sorbitol, monooleato de

- 2 -

polioxietileno sorbitol y monoestearato de polioxietileno sorbitol, [B] ácidos grasos 2-hidroxi C10-C22 tales como el ácido 2-hidroxisteárico, [C] aceites y [D] agua, en donde la relación A/B está comprendida entre 1:0,01 y 1:2.

5 También la patente JP 09110635 se refiere a composiciones, útiles como productos farmacéuticos, cosméticos y productos alimentarios que contiene: [A] ésteres de ácido graso poliglicerilo, [B] ácidos grasos 2-hidroxi C10-C22, [C] aceites y [D] agua, donde la relación en peso de A/C y
10 B/C es de 2,0 y 0,5 respectivamente, y muestra tamaños de partícula medio comprendidos entre 10 y 300 nm. Estas composiciones muestran buena estabilidad incluso en condiciones ácidas o de baja viscosidad o en presencia de elevadas cantidades de sales, siendo por tanto compatibles con
15 la piel.

Por otro lado, este ácido graso, también ha sido empleado como inhibidor de la oleamida hidrolasa, acción que se asocia al efecto de inducción del sueño de esta sustancia (Patentes US 6096784 y WO 9749667).

20 Así, por ejemplo, la patente US 6096784 se refiere al diseño y síntesis de inhibidores de oleamida hidrolasa, responsables de la hidrólisis de un lípido (cis-9-octadecenamida) inductor del sueño. Los inhibidores más potentes poseen un grupo carbonilo electrofílico capaz de
25 formar de manera reversible un (tio)hemiacetal o un (tio)hemicetal para imitar el estado de transición de una reacción catalizada por una proteasa de tipo cisteína o serina. Además de la actividad inhibitoria, algunos de los inhibidores mostraron actividad agonista lo cual induce el
30 sueño en animales de laboratorio.

Las estructuras hexagonales de membrana.

Los lípidos de membrana son capaces de ordenarse en mayor número de estructuras secundarias que las proteínas y ácidos nucleicos. La bicapa lipídica típica de las membranas biológicas es sólo una de dichas configuraciones secundarias. Se desconoce mucho sobre la abundancia y papeles de otras estructuras secundarias en células vivas. En un trabajo previo de los inventores se aporta una función de estas estructuras: aumentar la afinidad de unión de proteínas G a membranas (Escribá PV, Ozaita A, Ribas C, Miralles A, Fodor E, Farkas y García-Sevilla JA; 1997 Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 94, 11375-11380).

El concepto de estructura de membrana va mucho más allá de lo expuesto en algunas de las patentes del estado de la técnica (WO 87/04926 y WO 80/11286), en las que sólo se menciona la fluidez de membrana y se extiende el concepto a un campo mucho más amplio: la estructura de membrana. Las moléculas recogidas en nuestra patente actúan sobre la transición o paso de estructura lamelar a hexagonal. (Figura 1).

A la vista de los antecedentes citados, no existe todavía en el estado de la técnica otras aplicaciones relacionadas con el ácido 2-hidroxioleico o de análogos del mismo que sean de especial interés en el campo terapéutico del cáncer, de las patologías cardiovasculares y/o del control del peso corporal.

Tan sólo se describen productos dietéticos (GB 2140668, EP 0611568 y WO 02/0042) o extractos de cultivos de *M. cryophilus* (WO 89/11286), que consisten en mezclas complejas de diferentes compuestos que incluyen alguno de los descritos en la invención, tales como los ácidos grasos, particularmente el oleico y el palmioleico, por

- 4 -

ejemplo, y el uso de estas mezclas en el tratamiento de la hipertensión arterial, para el control de la obesidad o como antitumorales, pero sin adscribir a ninguno de los integrantes de la mezcla contemplados en la presente invención, 5 un papel específico en dicho efecto terapéutico. Tan sólo WO 02/051406 y WO 94/01100, describen el uso de ciertos ácidos grasos (C₁₄ - C₂₀) en el tratamiento del cáncer de próstata, que no es objeto de la presente invención, exclusivamente cuando se utilicen dichos ácidos 10 grasos descritos en el estado de la técnica.

OBJETO DE LA INVENCIÓN

La presente invención tiene por objeto encontrar nuevas aplicaciones del ácido 2-hidroxioleico y compuestos 15 análogos del mismo no relacionadas con las descritas en el estado de la técnica.

Un primer objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos poseen actividad como agentes antitumorales.

20 Un segundo objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos poseen actividad como agentes hipotensores.

Un tercer objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos 25 poseen actividad como agentes que inducen reducción del peso corporal.

Un cuarto objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos tienen aplicación como agentes reguladores de la transición 30 de estructura lamelar a hexagonal de las membranas celulares. Dicha regulación de la estructura de membrana influye en la actividad de proteínas G, así como de las entidades moleculares de su vía de transducción, es decir, de su ruta de propagación de señales. Un elevado número de

- 5 -

fármacos actúa sobre los receptores acoplados a proteínas G mediante interacción directa con este tipo de moléculas o con los mecanismos relativos a las señales celulares derivadas de su actividad. El ácido 2-hidroxioleico y sus 5 análogos, sin embargo, actúan sobre la estructura de membrana.

Las aplicaciones que se describen a continuación para el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos no han sido citadas por nadie previamente y su uso puede resultar beneficioso 10 para el tratamiento de ciertas patologías. En particular, se ha encontrado que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos presentan actividad antitumoral, actividad hipotensora (o anti-hipotensora) e inducen reducciones del peso corporal.

15 En la presente invención se justifican las nuevas aplicaciones del ácido 2-hidroxioleico y sus análogos utilizando modelos experimentales, en particular sistemas de análisis *in vitro*, sistemas de cultivos celulares y organismos vivos. Todos estos modelos de análisis indican, 20 sin lugar a dudas, que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos son unas moléculas que pueden utilizarse para fabricar medicamentos destinados al tratamiento del cáncer, destinados al tratamiento de enfermedades cardiovasculares y destinados al tratamiento de sujetos con problemas de 25 peso corporal u obesidad, así como de otras enfermedades o estados carenciales basados en la regulación de señales asociadas a proteínas G, mediada por la transición lamelar a hexagonal de la estructura de membrana.

30 **Descripción de la invención**

En la presente invención por "ácido 2-hidroxioleico" se entiende ácido α -hidroxioleico, ácido octadecenoico C18:1 cis Δ9 o ácido *cis*-2-Hidroxi-9-octadecenoico. Por sus análogos se entienden aquellos ácidos grasos que tengan el

- 6 -

doble enlace desplazado una o dos posiciones de la zona central y/o que tengan el doble enlace desplazado de una a cinco posiciones de la zona central y/o tengan de uno a seis átomos de carbono (Grupos CH_2) más o menos a cada lado 5 del doble enlace y/o que tengan un residuo (R) en posición 2 diferente al OH, con una masa atómica pequeña (M_w igual o inferior a 200 Da). Es indiferente que el estereoisómero correspondiente a la proyección del grupo R sea R ó S. En función de las diferentes moléculas ensayadas, se ha 10 observado que aquellas que tienen las fórmulas generales indicadas a continuación presentan unos efectos similares al ácido hidroxioleico y que, por lo tanto, se pueden catalogar como análogos del mismo.

Fórmula general I: $\text{COOH-CHR-(CH}_2\text{)}_m\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_3$ en 15 donde m y n tienen independientemente un valor de 0-15 y R puede ser H, OH, NH_2 , CH_3 , u otro residuo de masa molecular inferior a 200 Da.

En la presente invención por "Proteínas G" se entiende proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina, formadas por 20 tres subunidades (una alfa, una beta y una gamma) que transmiten señales de receptores acoplados a proteínas G hacia efectores (adenilil ciclase, guanilil ciclase, fosfolipasa C, canales iónicos, etc.).

En la presente invención se entiende por estructura de 25 membrana la estructura secundaria u ordenación de los lípidos en membranas naturales o sintéticas (liposomas).

En la presente invención por "efecto agudo" se entiende el efecto que se produce en un plazo de tiempo comprendido entre minutos y algunas horas después de una 30 única administración de un fármaco.

En la presente invención por "efecto crónico" se entiende el efecto que se produce en un plazo de tiempo comprendido entre pocos días y varias semanas de administración continua de un fármaco.

- 7 -

En la presente invención se entiende por formas farmacéuticamente aceptables, cualquiera de las usadas rutinariamente en el sector, incluyendo, de forma no limitativa: ésteres, especialmente los etílicos por sus 5 propiedades solubilizantes de ácidos grasos, éteres, amidas, sales, etc...

• Un objetivo de la presente invención es la aplicación del ácido 2-hidroxioleico y sus análogos en la regulación de la transición de estructura lamelar a hexagonal de las 10 membranas celulares. Las bases moleculares de este fenómeno radican en la interacción del ácido 2-hidroxioleico y sus análogos con membranas y en la modulación de la composición y/o estructura de membrana (Tablas 1 y 2).

15 **Tabla 1.**

Efecto de la unión de ácido 2-hidroxioleico sobre la temperatura de transición de estructura lamelar a hexagonal (H_{II}).

20	DEPE:2OHOA (mol:mol)	T_H^a (°C)
	1:0 (DEPE puro)	63
25	40:1	54
	20:1	48
	10:1	41

30 T_H^a indica la temperatura de transición de estructura lamelar a hexagonal.

Tabla 1. Indica los valores de temperatura de transición de estructuras lamelares a hexagonales en membranas de Dielaidoil fosfatidiletanolamina (DEPE). El valor control (en ausencia de 2-hidroxioleico) es de 63°C. La disminución

- 8 -

(dependiente de concentración) inducida por el ácido 2-hidroxioleico (20HOA) indica que esta molécula estabiliza la presencia de estructuras no lamelares. Esta importante alteración de la membrana celular tiene importantes consecuencias sobre la función molecular y celular. Todos los análogos al 2-hidroxioleico ensayados que tienen actividad terapéutica inducen también efectos sobre la estructura de membrana (Tabla 2).

10 **Tabla 2.**

Efecto de diferentes análogos del ácido hidroxioleico (fosfolípido:análogo 20:1 mol:mol) sobre la transición lamelar-hexagonal del fosfolípido dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE)

	T_h (°C)
20 Control (DEPE sólo)	61
Ácido oleico	45
Ácido aminoléico	49
Ácido metiloleico	50
25 Ácido cis-vaccénico	53
Ácido nervónico	55

30 **La modulación de la transición lamelar a no lamelar regula la actividad de proteínas G.**

El ácido hidroxioleico y los compuestos análogos al mismo son capaces de modular la actividad de las proteínas G, medida por la unión de [³⁵S]GTP γ S (Figura 5).

35 Esto se debe a que estas moléculas influencian la interacción de proteínas G con membranas y, por lo tanto,

- 9 -

su localización celular, tal y como se muestra en las fotografías de microscopía confocal (Figura 2). El efecto del ácido hidroxioleico y sus análogos sobre la localización y actividad de proteínas G no se debe a una interacción directa sobre ellas. En la Figura 6 se muestra el efecto que tienen estas moléculas sobre la actividad de proteínas G purificadas, en ausencia de membrana. A diferencia de lo que ocurre cuando las proteínas G están asociadas a membranas, la daunomicina (DNM) y el hidroxioleico (2OHOA), así como los análogos de éste, no tuvieron influencia sobre la actividad de estas proteínas (que son activadas sólo cuando están en membranas en contacto con receptores asociados a proteínas G).

Los receptores acoplados a proteínas G son ubícuos, constituyendo el 80% de los receptores de membrana que transmiten señales iniciadas por neurotransmisores, hormonas, neuromoduladores, citocinas, factores de crecimiento, etc. Entre otros procesos fisiológicos regulan la presión arterial, la proliferación y crecimiento celular o el peso corporal. Por ello, las moléculas descritas en esta invención pueden regular dichos procesos fisiológicos.

- Ensayos sobre estructura de membrana -

La técnica más eficaz y poderosa para estudiar la estructura de membrana es la difracción/scattering de rayos X. Mediante esta técnica hemos determinado que la estructura de la membrana es alterada por el ácido 2-hidroxioleico y análogos. La reducción en la temperatura de transición de estructura lamelar a hexagonal indica un efecto importante sobre la reordenación de las moléculas lipídicas en la membrana. Esta regulación de la reordenación es la base del efecto que tienen el ácido 2-hidroxioleico y análogos. Todos los análogos estudiados, que cumplen con la fórmula general, tienen actividad de

- 10 -

modular la membrana y de regular la proliferación celular (efectividad en cáncer), la presión sanguínea (efectividad en procesos cardiovasculares) y el peso corporal (efectividad en obesidad).

5 • Un objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioleico y análogos poseen actividad como agentes antitumorales.

10 En primer lugar, el ciclo celular se encuentra regulado por factores de crecimiento que se unen a receptores específicos de la superficie celular. La unión de dichos factores de crecimiento con los receptores da lugar a una cascada de reacciones destinadas a activar quinasas mitogénicas (cdk) que forman complejos diméricos con las proteínas asociadas a ciclo celular denominadas 15 ciclinas. Los complejos cdk/ciclina regulan las fases del ciclo celular y la progresión de este para producir la mitosis y la división celular.

20 Muchos receptores específicos de la superficie celular están acoplados a proteínas G, de manera que cuando se da la interacción del factor de crecimiento con el receptor se activa la proteína G desencadenándose la cascada de reacciones anteriormente mencionada.

25 Por tanto, una modulación de la localización y actividad de proteínas G permitiría controlar la división y crecimiento celular.

El mecanismo asociado a los efectos antitumorales del ácido 2-hidroxioleico y análogos se basa en el hecho que inducen la modulación de la localización y actividad de proteínas G y otras proteínas periféricas, como la proteína 30 quinasa C o las proteínas G pequeñas (tipo Ras, Raf, etc.). Esta modulación está asociada a la regulación de la estructura de los lípidos de membrana.

Se ha encontrado que el ácido 2-hidroxioleico actúa como inhibidor de la traslocación de proteínas G al núcleo

- 11 -

(Figura 2). De esta manera se consigue la inhibición de la proliferación celular, lo que queda confirmado por los aumentos marcados y significativos de los niveles de la proteína p21 y las disminuciones de las proteínas de ciclo celular cdk2 y ciclinas B y D3 (Figura 3 A y B). Asimismo, se han observado que en células en cultivo, el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos inducen incrementos significativos de la proteína kinasa C (entre el 40% y el 120% de incremento).

Dicha alteración en la localización celular de proteínas G produce modulaciones en su función, superiores a las producidas por el fármaco daunomicina, de amplia utilización en el tratamiento del cáncer. Estas alteraciones tienen importantes efectos inhibitorios sobre la proliferación y la supervivencia de células tumorales (Figura 4).

Un importante regulador del ciclo celular es la proteína p53, que ejerce un control de tipo negativo frenando la división celular a nivel de G1 (etapa previa a la mitosis). Esta proteína es sintetizada por la propia célula en respuesta a la aparición o alteraciones del ADN. Si el ADN replicado puede influir negativamente en las células hijas, la proteína p53 se activa dando lugar a la apoptosis (muerte celular programada). La activación de dicha proteína p53 hace que se expresen otros genes que codifican para proteínas reguladoras como la p21, p27, p16, etc., que inhiben la actividad/expresión de las ciclinas y cdk's (involucradas en el proceso del ciclo celular).

En muchos tipos de células tumorales, la proteína p53 aparece mutada e/o inactiva, produciéndose la proliferación de células transformadas (cancerosas). La presencia de ácido 2-hidroxioleico y/o análogos en las células induce la activación de la ruta de señales asociada a p53, lo cual induce el inicio de la apoptosis o la parada del ciclo

- 12 -

celular en diferentes tipos de células tumorales. Con el fin de llevar a cabo el primer objetivo de la presente invención se han utilizado modelos *in vitro* e *in vivo*. En este sentido, en este sentido, el ácido 2-hidroxioleico y 5 todos los análogos estructurales que cumplen con la fórmula general I descrita anteriormente han mostrado tener una capacidad antitumoral importante. Las moléculas análogas al ácido 2-hidroxioleico (2-hidroxi-cis-9-octadecenoico) ensayadas han sido: ácido 2-metil-oleico (2-metil-cis-9- 10 octadecenoico), 2-amino-oleico (2-amino-cis-9-octadecenoico), ácido oleico (cis-9-octadecenoico), ácido palmitoleico (cis-9-hexadecenoico), ácido cis vaccénico (cis-11-octadecenoico) y ácido nervónico (cis-15-tetracosenoico). Estas moléculas han mostrado detener la proliferación 15 celular o inducir la muerte de diferentes tipos de células tumorales (p.ej., células humanas de cáncer de pulmón A549, linfocitos T jurkat, etc.) (Figura 4). Estos resultados demuestran la actividad antitumoral de los ácidos grasos descritos y que la estructura básica del ácido 2- 20 hidroxioleico puede presentar pequeñas variaciones sin que se altere su actividad antitumoral.

Otros modelos moleculares han permitido confirmar que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos poseen una actividad antitumoral superior a la que presentan otros fármacos 25 antitumorales, como por ejemplo las antraciclinas, y por lo tanto se trata de compuestos de elevado interés terapéutico. En membranas de fibroblastos 3T3, se ha podido comprobar que la presencia de 200 μ M de ácido 2-hidroxioleico y/o ácido oleico (uno de los análogos del ácido 2-hidroxioleico) induce una inhibición del 75-84% en la actividad de 30 proteínas G en células NIH 3T3, mientras que 200 μ M de daunomicina induce una inhibición del 46% en dicha actividad (Figura 5).

- 13 -

La efectividad antitumoral del ácido 2-hidroxioleico y su análogo el ácido oleico aparece en la Figura 8, donde se observa la desaparición de unas metástasis tumorales cerebrales, formadas a partir de un adenocarcinoma pulmonar, tras el tratamiento con ácido 2-hidroxioleico. El tratamiento con esta ácido 2-hidroxioleico y ácido oleico produjo la desaparición total del cáncer. Estos resultados demuestran que (a) el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos son unas moléculas que pueden ser utilizadas para la fabricación de medicamentos destinados al tratamiento del cáncer; (b) que su espectro de acción es amplio (ha sido efectivo sobre diferentes tipos de células tumorales en cultivo o en organismos vivos) y (c) que supera a otras moléculas utilizadas para el tratamiento del cáncer por su potencia antitumoral, por su ausencia de efectos secundarios y por ser su administración por vía oral, aunque también pueda realizarse por vía intravenosa o subcutánea.

- Ensayos antitumorales -

Se ha demostrado la eficacia antiproliferativa del ácido hidroxioleico en células de cáncer de pulmón humano A549 y de leucemia humana (Jurkat). En la Figura 3 se muestra la inducción de la proteína antiproliferativa p21, que viene acompañada por la disminución de las proteínas cdk2, ciclina B y ciclina D3, necesarias para que las células tumorales puedan dividirse. Efectos similares los produjeron todos los análogos ensayados que cumplían la fórmula general estructural enunciada arriba. Este efecto antiproliferativo del ácido 2-hidroxioleico y sus análogos quedó demostrado por la reducción de la densidad celular en células tumorales en cultivo (Figura 4). Este efecto antiproliferativo se ha observado también utilizando otras técnicas y otros tipos celulares: en astrocitos primarios de rata, estos ácidos grasos tienen un efecto antiprolife-

- 14 -

rativo, que he estudiado mediante la incorporación de timidina tritiada. Asimismo, el hidroxioleico y sus análogos son capaces de inducir apoptosis o muerte celular programada en células de cáncer humanas. Por un lado, la 5 degradación de la PARP (Figura 3C), por otro la alteración de la morfología celular y la presencia de residuos celulares (Figura 4) demuestran el efecto inductor de muerte celular del 2-hidroxioleico y sus análogos. Mediante experimentos de citometría de flujo, se determinó 10 que en presencia de ácido 2-hidroxioleico la cantidad de células de leucemia humana (Jurkat) vivas era sólo un 10% de las que quedaron vivas con etopósido, un conocido agente antitumoral.

Finalmente, el estudio del efecto en humanos ha revelado 15 que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos pueden constituir una familia de fármacos antitumorales de gran relevancia. En la Figura 8 se muestra el efecto del tratamiento con ácido 2-hidroxioleico y ácido oleico sobre tumores en humanos. El caso mostrado corresponde a una 20 paciente en la que quimio- y radioterapia suministradas anteriormente no produjeron reducciones de los tumores cerebrales.

• Un objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos son agentes con 25 actividad hipotensora.

La regulación de la actividad de proteínas G regula la presión arterial.

Existe una relación entre los fármacos de la invención 30 y la actividad de proteínas G y la presión arterial. Un dato que confirma lo expuesto antes es un estudio realizado en humanos y en el que hemos visto que los individuos hipertensos tienen alteraciones en los niveles de lípidos de membrana (Tabla 3). Los lípidos de membrana influyen

- 15 -

sobre la transición lamelar-hexagonal, que a su vez determina la localización y funcionalidad de proteínas G. De hecho, en hipertensos se observa una alteración en los niveles de proteínas G asociadas a la membrana que se debe 5 a la mencionada alteración de los lípidos de membrana y de la facilidad para formar fases hexagonales. Si la modulación de las estructuras no lamelares de membrana y la consiguiente relocalización de las proteínas G produce hipertensión, a través de la regulación de la transición 10 lamelar-hexagonal de los lípidos de membrana se puede conseguir la regulación de la localización de las proteínas de membrana y, finalmente, de la presión arterial (Figura 7).

- 16 -

Tabla 3.

Composición de ácidos grasos de fosfolípidos y ésteres de colesterol en membranas de eritrocitos de sujetos

5 normotensos (control) e hipertensos (mg/100mg).

Ácido Graso	Fosfolípidos		Esteres	Colesterol
	Hiperten- sos	Controles		
C14:0	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.2
C14:1n-5	1.7 ± 0.2	2.2 ± 0.3 **	0.7 ± 0.2	n.d.***
C16:0	23.7 ± 0.6	23.1 ± 0.5	5.1 ± 0.6	14.3 ± 0.5 *
C16:1n-9	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	3.1 ± 0.6	2.5 ± 0.3 **
C16:1n-7	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	2.4 ± 0.4	1.7 ± 0.1 ***
C16:4n-3	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.5	n.d.	n.d.
C18:0	16.6 ± 0.3	17.1 ± 0.6	3.2 ± 0.5	2.9 ± 0.5
C18:1n-9t	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.0 ***	n.d.	n.d.
C18:1n-9	16.3 ± 0.6	16.0 ± 0.8	18.4 ± 1.2	16.7 ± 0.6 **
C18:1n-7	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.2 **	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.2 **
C18:2 n-6	12.5 ± 0.7	13.4 ± 0.7*	45.8 ± 2.8	51.1 ± 1.6 ***
C18:3n-6	0.4 ± 0.0	n.d.***	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1 **
C18:3n-3	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	n.d.	n.d.
C20:2n-6	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
C20:4n-6	17.0 ± 0.4	16.5 ± 0.4	7.0 ± 0.6	6.4 ± 0.9 *
C22:4n-6	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.1	n.d.	n.d.
C22:6n-3	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2	n.d.	n.d.
C24:1n-9	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	n.d.	n.d.
Total SFA	41.2 ± 1.1	41.1 ± 0.7	19.3 ± 1.2	18.2 ± 1.1 *
Total MUFA	22.6 ± 0.6	21.7 ± 0.7 *	25.9 ± 1.6	22.7 ± 0.8 ***
Total PUFA	36.2 ± 1.2	38.2 ± 0.9 **	54.8 ± 2.4	59.1 ± 1.6 ***
PUFA:SFA	0.8 ± 0.04	0.9 ± 0.03	2.7 ± 0.3	3.4 ± 0.3 ***
PUFA:MUFA	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.6 ± 0.2 ***

Los valores son medias ± error standard de la media (n=28).
 SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. n.d.: no detectado.

Se ha podido comprobar que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos también tienen un marcado efecto hipotensor, ya que inducen reducciones de las presión arteriales sistólica y diastólica, sin modificar el ritmo cardiaco (Figuras 9 a y b y 10). El efecto hipotensor producido por

- 17 -

el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos es que induce una reducción de la presión arterial de forma aguda (que es evidente desde las 2 horas de tratamiento) y crónica (que se mantiene durante días y semanas mientras se mantenga el 5 tratamiento). El ácido aminoleico, por ejemplo, reduce la presión arterial en 15 mm Hg en tratamientos crónicos de una semana.

La presión arterial está controlada por varios sistemas de receptores acoplados a proteínas G, tales como 10 receptores vasopresina, adrenérgicos, etc.

La interacción entre las hormonas involucradas en el control de la presión arterial con los receptores asociados a proteínas G estimuladoras es modulada por la acción del ácido 2-hidroxioleico y moléculas análogas.

15 Dichos ácidos grasos regulan la comunicación entre receptor, proteína G y efecto. El resultado es una modulación de las señales de AMP cíclico, fosfolipasa C y óxido nítrico, que da lugar a una reducción en la presión arterial. Dicho efecto está también relacionado con la 20 regulación de la estructura de membrana. La mayor ventaja farmacológica del ácido 2-hidroxioleico y análogos es que, a diferencia de otros fármacos hipotensores, no tienen efectos sobre el ritmo cardíaco (es decir, no aumentan o disminuyen significativamente la frecuencia cardíaca). Una 25 ventaja adicional de estos compuestos es que controlan otros dos factores de riesgo cardiovascular: el perfil lipídico/lipoproteíco sérico y el peso corporal (ver adelante). Dado que el control único de la presión arterial no basta para alargar la vida del enfermo y que es 30 necesario controlar otros factores de riesgo cardiovascular, estos ácidos grasos aventajan a otras moléculas empleadas en pacientes con patologías cardiovasculares.

- 18 -

- Ensayos hipotensores -

El ácido 2-hidroxioleico indujo reducciones significativas en la presión arterial en ratas (Figura 9). Estas 5 bajadas se produjeron tanto de forma aguda (a las 2 horas del tratamiento, 19 ± 6 mm Hg, $P < 0,01$, $n = 6$) como de forma crónica (1 semana, 26 ± 7 mm Hg, $P < 0,001$, $n = 6$). Asimismo, tratamientos agudos y crónicos de 1 mg/kg a 10 mg/kg también produjeron reducciones significativas de la presión arterial y dependientes de concentración.

10 En humanos el ácido 2-hidroxioleico también produjo disminuciones importantes y significativas de la presión arterial, véase Figura 9.

15 Asimismo, los análogos del ácido 2-hidroxioleico que cumplen con la fórmula general indicada arriba tuvieron un efecto hipotensor (Figura 10). En todos los casos, las 20 disminuciones de presión arterial fueron significativas en comparación con los controles ($*P < 0,05$, $**P < 0,01$).

Estos datos indican claramente que el ácido 2-hidroxioleico y sus análogos son unos agentes eficaces para 25 el tratamiento clínico/farmacológico de la hipertensión arterial.

• Un objetivo de la presente invención es demostrar que el ácido 2-hidroxioleico y análogos poseen actividad como agentes que inducen reducciones del peso corporal (Figura 25 11).

Además de la actividad antitumoral e hipotensora del ácido 2-hidroxioleico y análogos, éstos inducen reducciones del peso corporal.

El peso corporal está regulado, entre otros, por 30 factores como la capacidad metabólica del individuo y el control de la ingesta.

El control de la ingesta viene determinado por la sensación de saciedad, la cual a su vez se regula a nivel hormonal. Así por ejemplo, la deficiencia de nutrientes

- 19 -

estimula la secreción de hormonas que dan lugar a una sensación de apetito. Después de la ingesta, una vez repuesto los nutrientes, se estimula la secreción de hormonas que dan lugar a una sensación de saciedad.

5 Se ha encontrado que el ácido 2-hidroxioleico y análogos producen efectos de saciedad, induciendo reducciones en la ingesta de alimentos. Este control también está mediado por receptores de citoquinas, leptinas, adrenoreceptores, y otros receptores acoplados a proteínas 10 G, cuya actividad es modulada por estos ácidos grasos.

En los animales tratados este efecto sobre la saciedad supuso un consumo de pienso entre un 15% y un 30% menor que los animales controles.

15 - Ensayos de control del peso corporal -

Ratas tratadas con estas moléculas disminuyeron su peso corporal durante tratamientos crónicos (de 5 a 17 días). En estos experimentos, las ratas tratadas con el ácido 2-hidroxioleico o sus análogos, en particular el 20 ácido aminoleico, tenían acceso libre a comida y agua, de forma similar al grupo de ratas tratadas control (Figura 11). En estas condiciones, las ratas experimentaron una disminución del peso corporal progresiva a partir del primer día de tratamiento, hasta 17 gramos en el séptimo 25 día de tratamiento (5% del peso corporal normal de una rata de Sprague-Dowley de 2-3 meses de edad). El pienso suministrado a estos animales se pesó y se pudo observar un menor consumo durante el tiempo que duró el tratamiento, lo que confirma que los tratamientos con las moléculas 30 relativas a esta invención producen un efecto de saciedad en el animal. Experimentos similares realizados en ratones adultos, durante períodos de hasta 28 días con ácido 2-hidroxioleico, demuestran reducciones en el peso corporal de un 15% a un 25%, respecto a ratones control (tratados

- 20 -

con vehículo).

Descripción de las figuras

Figura 1: Algunas de las muchas estructuras, además de
5 la lamelar, que pueden adoptar las membranas.

La Figura 2 muestra la localización celular de
proteína Gai₂ marcada con fluoresceína en astrocitos
primarios de cerebro de rata. En células control, el
marcado indica la presencia de esta proteína en toda la
10 célula, en especial en el núcleo (flecha). En células
tratadas con 2-hidroxioleico (20HOA), el marcado aparece en
membrana y citosol, pero no en núcleo (flecha).

La Figura 3 muestra el efecto del ácido 2-
hidroxioleico en marcadores moleculares de proliferación y
15 muerte celular. El panel A muestra el efecto del ácido 2-
hidroxioleico (20HOA) sobre las proteínas de ciclo celular
cdk2, ciclina B y ciclina D3 en células de cáncer de pulmón
humano A549. La bajada de estas proteínas demuestra que
este ácido graso induce la parada del ciclo celular, es
20 decir, la parada de la división celular. En el panel B se
muestra el efecto del ácido 2-hidroxioleico (20HOA) sobre
la proteína p21 en células A549 tras incubación durante 24
y 48 horas. La proteína p21 inhibe el ciclo celular, por lo
que es una proteína antiproliferativa. Los grandes aumentos
25 que induce el ácido 2-hidroxioleico sobre esta proteína
justifican la parada del ciclo y la proliferación de
células tumorales. El panel C muestra la degradación de la
Poli-ADP Ribosa polimerasa (PARP) en células de leucemia
humana (Jurkat) (etopósido: 25 [E1] y 250 µM [E2]; ácido 2-
30 hidroxioleico: 10 [O1], 100 [O2] y 1000 µM [O3]). La
disminución de los niveles de este enzima, o la evidencia
de su degradación, indican el inicio de la apoptosis o
muerte celular programada. En estos experimentos se empleó
el etopósido como control positivo, ya que se trata de una

- 21 -

molécula conocida como inductora de apoptosis y antitumoral.

La Figura 4 muestra el efecto del ácido 2-hidroxioleico y sus análogos sobre la proliferación de 5 células de cáncer de pulmón humano A549 (A) y células Jurkat de leucemia humana (B). Tanto el ácido 2-hidroxioleico (2OHOA) como sus análogos, que cumplen todos la fórmula indicada anteriormente, inducen la parada de 10 división y la muerte de células tumorales (OA: ácido oleico; VA: ácido cis vaccénico; POA: ácido palmitoleico; NA: ácido nervónico; 2MOA: ácido 2-metil oleico; 2NOA: ácido 2-amino oleico).

La Figura 5 muestra la fijación de [³⁵S]GTP_γS a membranas de células NIH 3T3 transfectadas con el 15 adrenoceptor $\alpha_{2A/D}$ de rata. Este parámetro mide la actividad de proteínas G. La presencia de 2-hidroxioleico induce una disminución de la función de las proteínas G aun mayor que la antraciclina daunomicina (DNM). Las antraciclinas son 20 potentes fármacos antitumorales, por lo que el 2-hidroxioleico es potencialmente más eficaz ante tumores. Los análogos del 2-hidroxioleico producen un efecto similar al del ácido 2-hidroxioleico.

Figura 6: El ácido hidroxioleico y sus análogos no tuvieron efecto sobre proteínas G puras (en ausencia de 25 membrana). Esto demuestra que su efecto sobre la actividad de proteínas G es mediado por la regulación de las estructuras no lamelares de membrana. La daunomicina (DNM) tuvo un comportamiento similar al control.

Figura 7: Niveles de proteínas G en membranas de 30 eritrocitos de sujetos normotensos (barras vacías) e hipertensos (barras llenas). Los niveles de proteínas $G\alpha_{i1/2}$ (Gi), $G\alpha_o$ (Go), $G\alpha_s$ (Gs) y $G\beta\beta$ (Gb) son significativamente inferiores en hipertensos. Los valores de las

- 22 -

barras son medias \pm error standard de la media *P<0.05,
**P<0.01.

La Figura 8 muestra metástasis (tumores) cerebrales, formadas a partir de un adenocarcinoma pulmonar. La imagen 5 de la izquierda (8a) corresponde a los tumores antes del tratamiento y las de la derecha (8b, 8c y 8d) corresponden a los tumores después del tratamiento con 2-hidroxioleico en diferentes fechas. Como se aprecia, uno de los tumores ha desaparecido de forma más rápida y el otro de forma más 10 lenta.

La Figura 9a muestra el efecto agudo (2 horas, barras negras) y crónico (3 inyecciones diarias durante 7 días, barras blancas) del ácido hidroxioleico (30 mg/kg) sobre la presión arterial sistólica en ratas Sprague-Dowley. Dosis 15 inferiores de esta molécula (1-10 mg/kg) produjeron efectos similares, aunque menos marcados. *P<0.01.

La figura 9b muestra el efecto del ácido 2-hidroxioleico (30 mg/kg) sobre la presión arterial en humanos. Esta gráfica representa la presión arterial 20 sistólica en función del día de tratamiento. Los días anteriores al tratamiento se indican con valores negativos. *P<0.05, **P<0.01.

La Figura 10 muestra el efecto de tratamientos agudos con el ácido 2-hidroxioleico (2OHOA) y sus análogos 25 2-metil-oleico (2MOA), oleico (OA), palmitoleico (POA), cis vaccénico (VA) y nervónico (NA). Todos los tratamientos realizados con el ácido 2-hidroxioleico y los análogos que cumplen la fórmula general dada arriba indujeron disminuciones significativas (*P<0.05, **P<0.001) de la presión 30 arterial sistólica en ratas Sprague-Dowley.

La Figura 11 muestra el efecto del ácido 2-hidroxioleico (OHOA) y de sus análogos, los ácidos oleico (OA) y palmitoleico (POA) sobre el peso corporal (3 inyecciones diarias de 30 mg/kg). Los animales (ratas Sprague-

- 23 -

Dowley) tenian acceso libre a comida y agua en todo momento.

- 24 -

REIVINDICACIONES

1.- Uso de compuestos de fórmula general I: COOH-CHR-(CH₂)_m-CH=CH-(CH₂)_n-CH₃, donde R puede ser cualquier grupo de peso molecular inferior a 200 Da, m y n tienen independientemente un valor comprendido entre 0-15, en la fabricación de medicamentos y formas farmacéuticamente aceptables, útiles en el tratamiento del cáncer con excepción de la utilización de los ácidos grasos C₁₄ - C₂₀ en la fabricación de medicamentos y formas farmacéuticamente aceptables útiles en el tratamiento del cáncer de próstata.

15 2.- Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque R es preferentemente H, OH, NH₂ o CH₃.

3.- Uso según las reivindicaciones 1, 2, caracterizado porque los compuestos de fórmula general I, tienen preferentemente entre 12 y 28 átomos de carbono.

20 4.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los compuestos de fórmula general I son preferentemente el ácido 2-hidroxioleico, el ácido 2-metil-oleico, el ácido 2-amino-oleico, el ácido vaccénico o el ácido nervónico.

25 5.- Uso de compuestos de fórmula general I: COOH-CHR-(CH₂)_m-CH=CH-(CH₂)_n-CH₃, donde R puede ser cualquier grupo de peso molecular inferior a 200 Da, m y n tienen independientemente un valor comprendido entre 0-15, en la fabricación de medicamentos y formas farmacéuticamente aceptables útiles en el tratamiento de la hipertensión, con

- 25 -

excepción del ácido palmitoleico cuando se utilice en la fabricación de medicamentos útiles en el tratamiento de la apoplejía cerebral.

5 6.- Uso según la reivindicación 5, caracterizado porque R es preferentemente H, OH, NH₂ o CH₃.

7.- Uso según las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado porque los compuestos de fórmula general I, tienen preferentemente entre 12 y 28 átomos de carbono.

10 8.- Uso según las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque los compuestos de fórmula general I son preferentemente el ácido 2-hidroxioleico, el ácido 2-metil-oleico, el ácido vaccénico, el ácido nervónico, el ácido oleico, el ácido palmitoleico o el ácido aminoleico.

15 9.- Uso de derivados de compuestos de fórmula general I COOH-CHR-(CH₂)_m-CH=CH-(CH₂)_n-CH₃, donde R puede ser cualquier grupo de peso molecular inferior a 200 Da, m y n tienen independientemente un valor comprendido entre 0-15, en la fabricación de medicamentos y formas farmacéuticamente aceptables útiles en el tratamiento de la obesidad.

20 25 10.- Uso según la reivindicación 9, caracterizado porque R es preferentemente H, OH, NH₂ o CH₃.

30 11.- Uso según las reivindicaciones 9 o 10, caracterizado porque los compuestos de fórmula general I, tienen preferentemente entre 12 y 28 átomos de carbono.

12.- Uso según las reivindicaciones 9 a 11 caracterizado porque el compuesto de fórmula general I es preferentemente el ácido 2-hidroxioleico o el ácido aminoleico.

- 26 -

13.- Uso de compuestos de fórmula general I: $\text{COOH-CHR-}(\text{CH}_2)_m\text{-CH=CH-}(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3$, donde R puede ser cualquier grupo de peso molecular inferior a 200 Da, m y n tienen independientemente un valor comprendido entre 0-15, en la fabricación de medicamentos y formas farmacéuticamente aceptables útiles en enfermedades cuya etiología se base en la transición lamelar-hexagonal de la estructura de la membrana celular que implique la regulación o localización de proteínas G y de los receptores acoplados a las mismas.

10 14.- Uso según la reivindicación 13, caracterizado porque R es preferentemente H, OH, NH_2 o CH_3 .

15 15.- Uso según las reivindicaciones 13 o 14, caracterizado porque los compuestos de fórmula general I, tienen preferentemente entre 12 y 28 átomos de carbono.

20 16.- Uso según las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado porque el compuesto de fórmula general I es preferentemente el ácido 2-hidroxioleico.

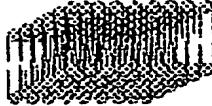
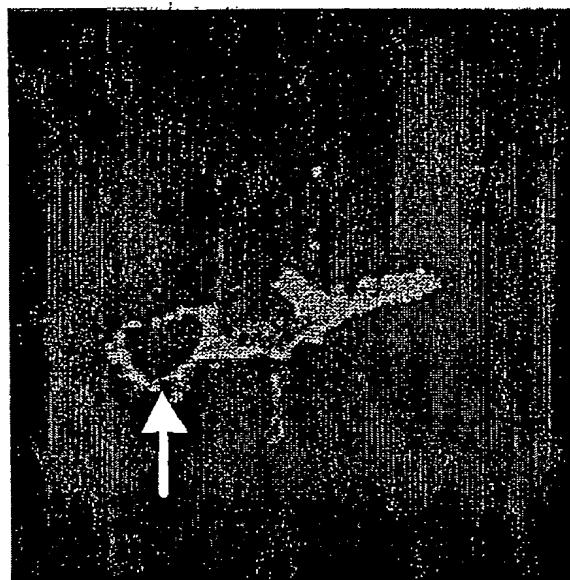
Fosfolípido	Forma	Organización	
Fosfatidil- colina	 		Lamellar (L)
Lisofosfa- tidilcolina	 		Hexagonal (H_i)
Fosfatidile- tanolamina	 		Hexagonal (H_{ii})

FIGURA 1



20HOA

Control

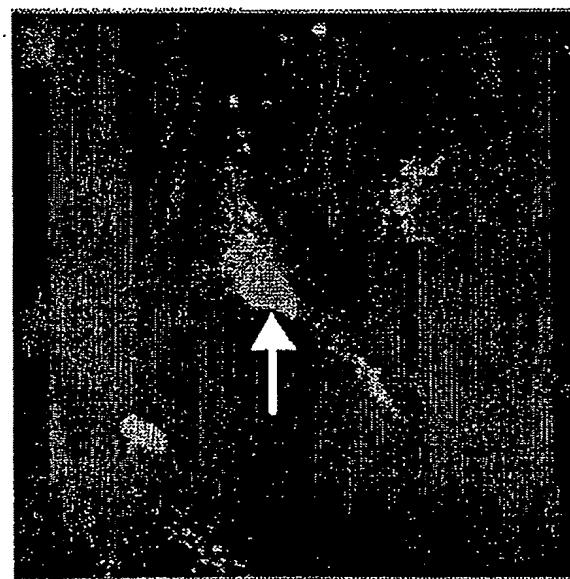


FIGURA 2

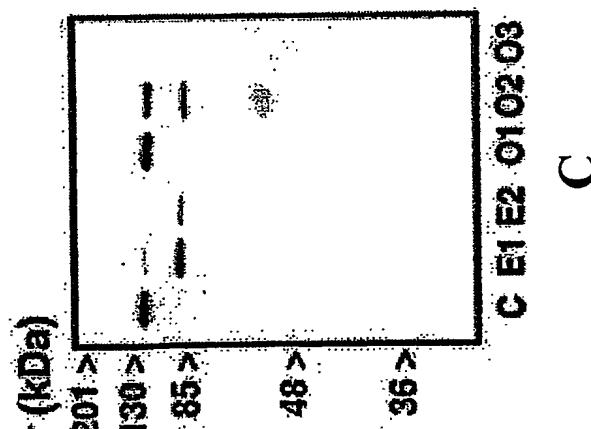
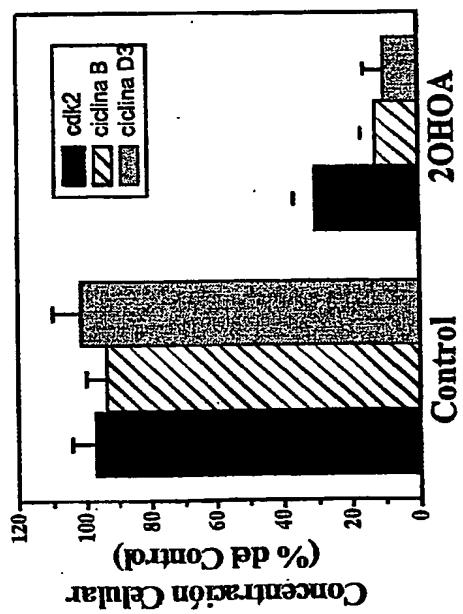
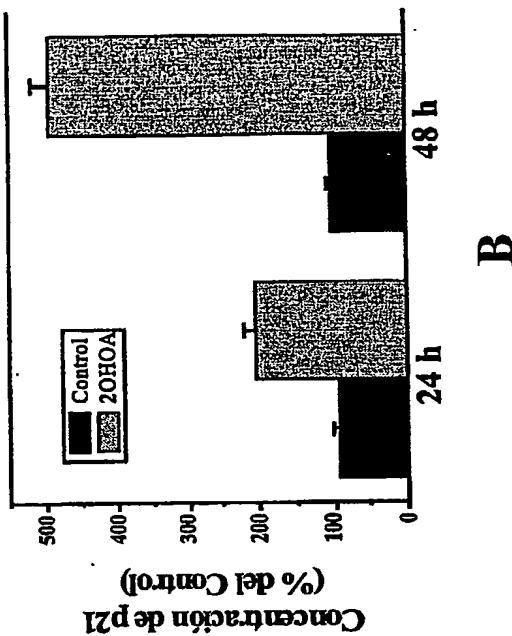
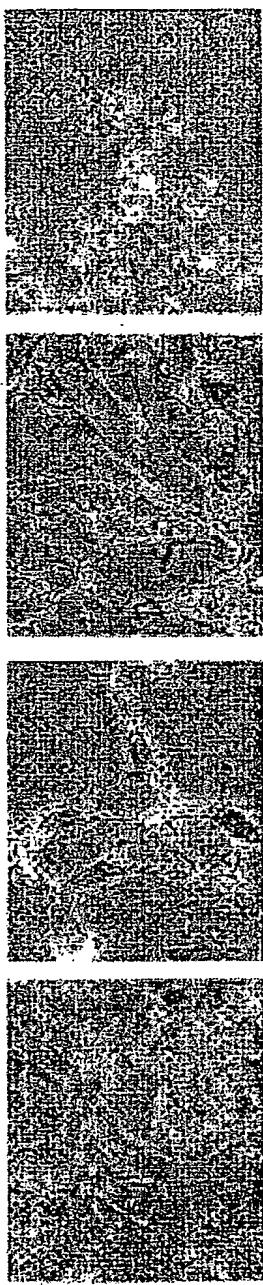


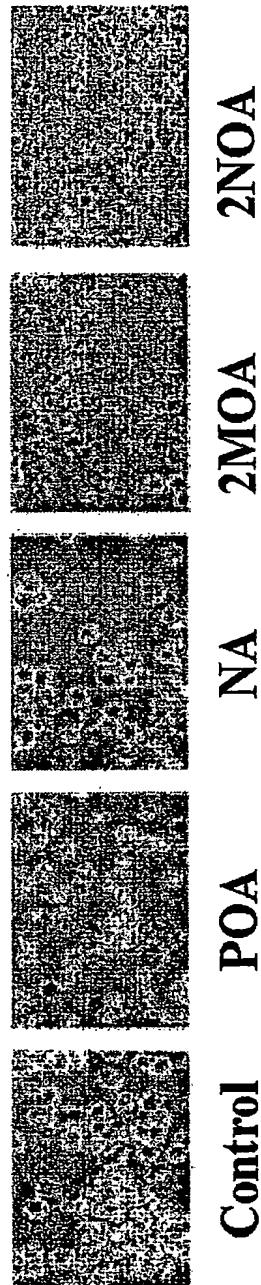
FIGURA 3

A



Control 20HOA OA VA

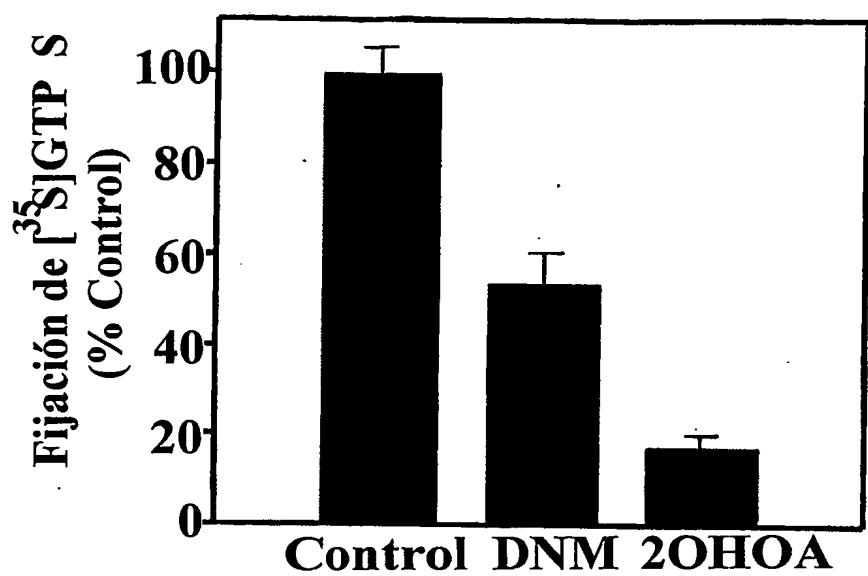
B



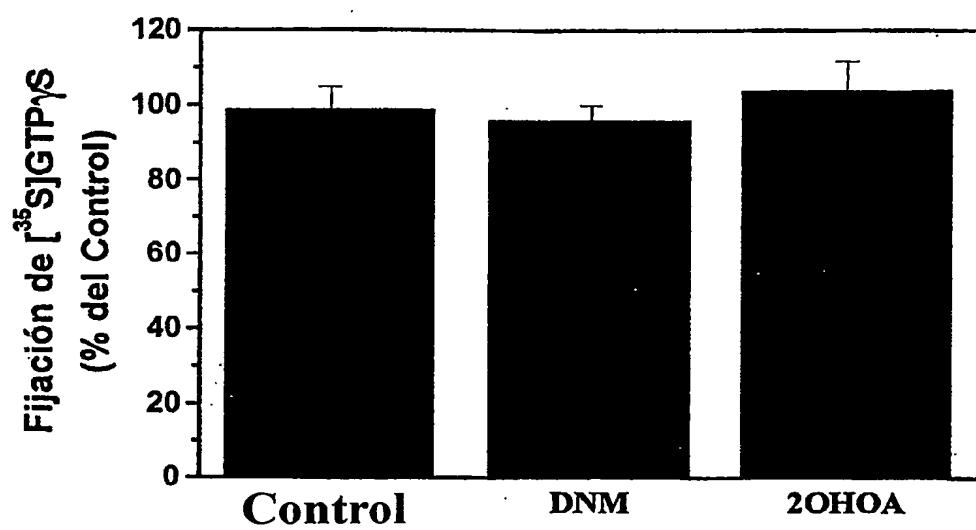
Control POA NA 2MOA

FIGURA 4

5/10

**FIGURA 5**

6/10

**FIGURA 6**

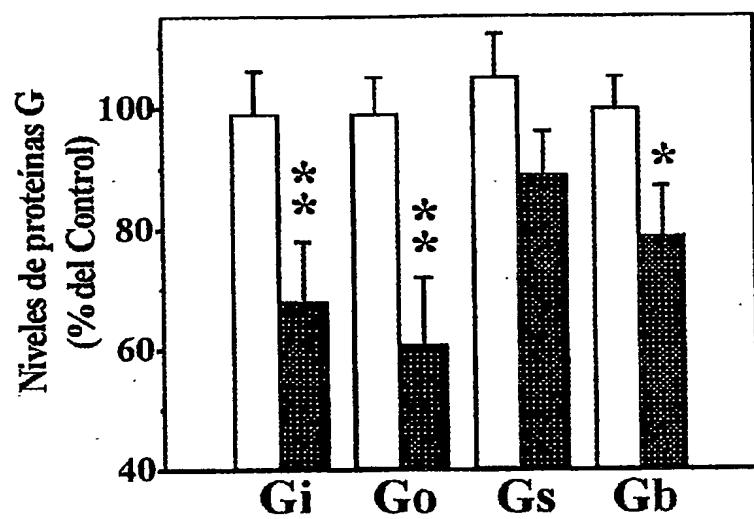
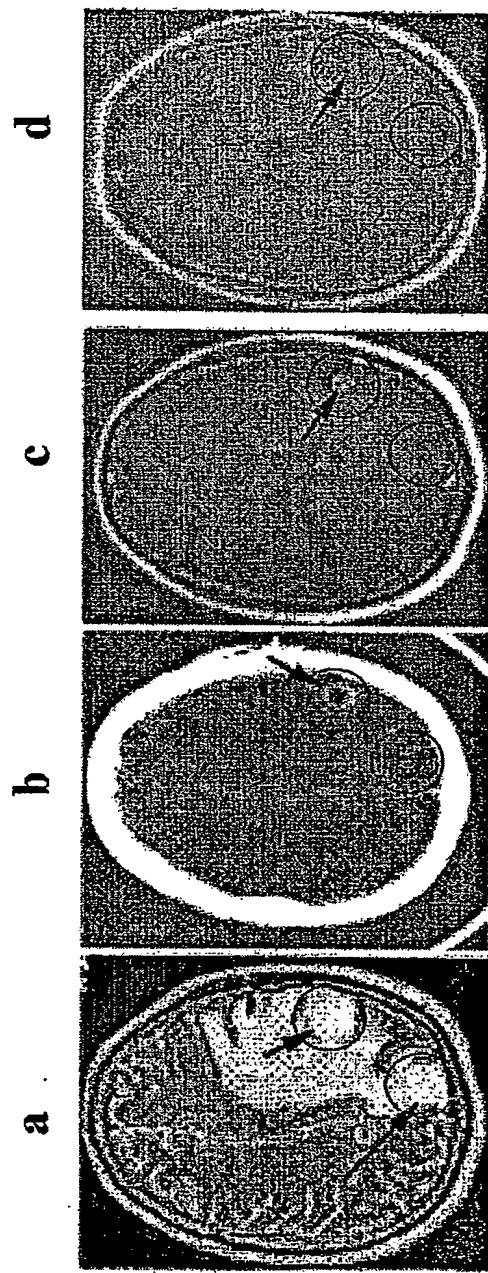
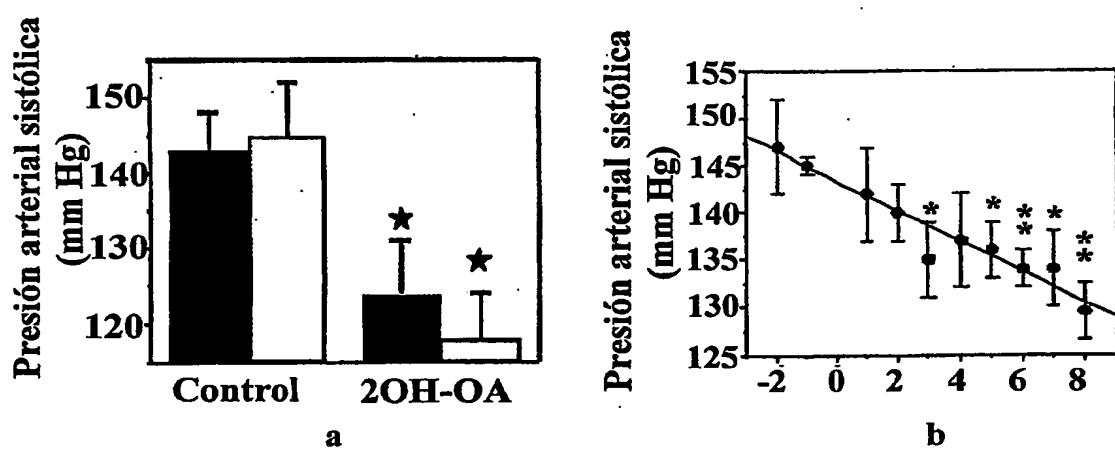


FIGURA 7



Octubre, 2000 Abril, 2001 Junio, 2001 Diciembre, 2001

FIGURA 8

**FIGURA 9**

10/10

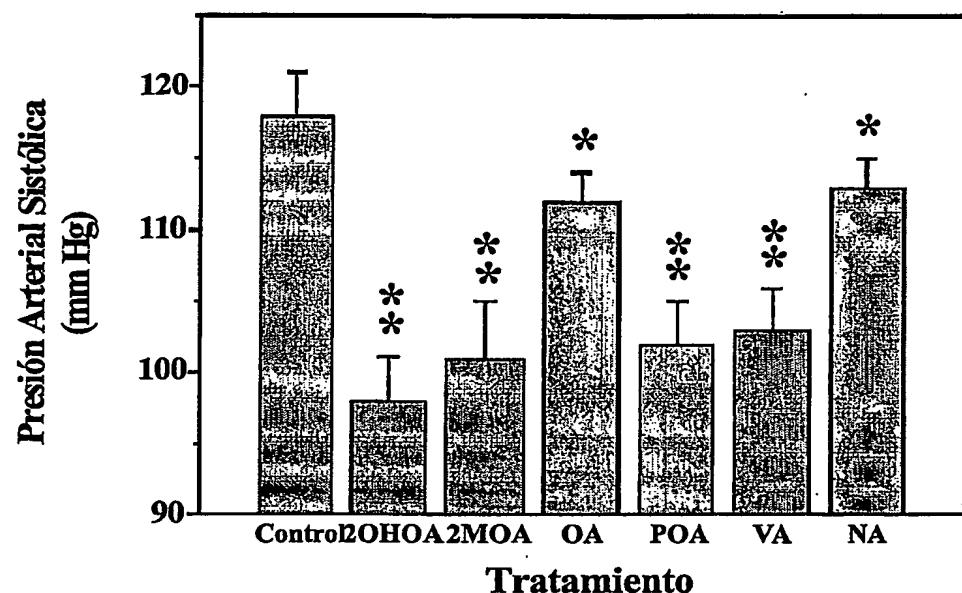


FIGURA 10

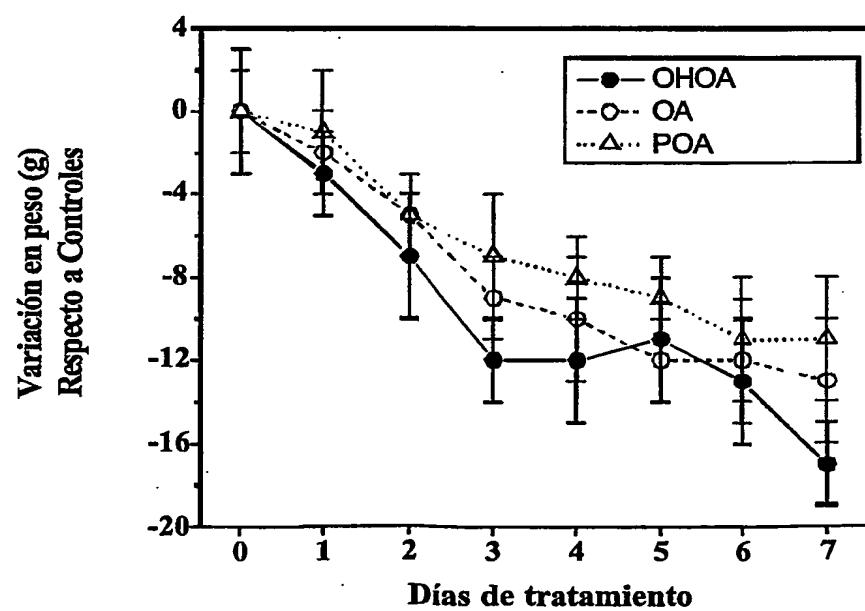


FIGURA 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 02/00475

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/20, A61P35/00, 9/10, 9/12, 3/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94/01100 A1 (ARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 20.01.1994, the whole document	1-4
P,X	WO 02/051406 A1 (CREIGHTON UNIVERSITY) 04.07.2002, the whole document	1-4
X	US 6214875 B1 (YANG Z.) 10.04.2001, the whole document	1-4
X	SEBASTIANO, B. et al.: "Vaccenic acid feeding increases tissue levels of conjugated linoleic acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland", Nutrition and Cancer, 2001, vol. 41 (1-2), pp.: 91-97, ISSN 0163-5581, the whole document, in particular page 57, column 2, lines 7-9	1-4
X	AWAD ATIF, B. et al.: "18:1 n 7 fatty acids inhibit growth and decrease inositol phosphate release in HT-29 cells compared to n9 fatty acids", Cancer Letters, 1995, vol. 91 (1), pp.: 55-61, ISSN 0304-	1-4

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 January 2003 (16.01.03)

Date of mailing of the international search report

23 January 2003 (23.01.03)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 02/00475

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96/31457 A1 (SCOTIA HOLDINGS PLC) 10.10.1996, the whole document	5-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 02/00475

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9401100 A	20.01.1994	EP 0652749 A US 5422371 A JP 8501771T T US 5605929 A	17.05.1995 06.06.1995 27.02.1996 25.02.1997
WO 02051406 A	04.07.2002	NONE	
US 6214875 A	10.04.2001	WO 9953086 A AU 3546199 A EP 1075533 A	21.10.1999 01.11.1999 14.02.2001
WO 9631457 A	10.10.1996	CA 2217258 A AU 5280996 A EP 0832058 A NZ 304924 A	10.10.1996 23.10.1996 01.04.1998 26.05.2000